

T. Landgraf

Mainx 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552619_0061

Aus dem Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Spektralphotometrische Untersuchungen zur
Problematik des Nachweises von SP 54 (Sul-
fatiertes Polyanion 1954) durch die Meta-
chromasiereaktion

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Thomas Landgraf
aus Gera

Mainz - 1974



Fachbereich 05	Fachbereichs-Dekan	Professor Dr.O.Harth
	Referent	Professor Dr.G.Müller
	Korreferent	Professor Dr.A.Mayet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINFÜHRUNG	
1. Die Metachromasie	1
2. Der Chromotropbegriff	7
II. PROBLEMSTELLUNG	9
III. EIGENE VERSUCHE (Material und Methodik)	13
IV. ERGEBNISSE	
1. Die Absorptionsbanden von 1,9 DMMB	19
2. Der Einfluß von Elektrolyten auf das Spektrum von 1,9 DMMB	22
3. Der Einfluß von Elektrolyten auf das Farbstoff-Chromotrop-System	23
4. Messungen im menschlichen Handschweiß	27
5. Messungen an Seifenlösungen	30
V. DISKUSSION	32
VI. ZUSAMMENFASSUNG	35
VII. LITERATURVERZEICHNIS	36

Metachromasie

Unter dem Begriff Metachromasie versteht der Histochemiker die mit dem Auge deutlich wahrnehmbare Änderung des Absorptionsspektrums eines Farbstoffes bei dessen Bindung an bestimmte Gewebselemente. Diese von Scheibe und Zanker (25) gegebene Definition ist noch weitgehend an dem von Ehrlich (9) 1879 geprägten Begriff Metachromasie orientiert. In vitro Versuche, vor allem physikalisch-chemische Untersuchungen, haben zu neuen Definitionen dieses histologisch bedeutsamen Phänomens geführt. So können durchaus alle spektralen Veränderungen, die im Verschwinden bestehender Banden, im Auftreten neuer Banden oder in einer Bandenverschiebung bestehen, im weitesten Sinne als metachromatisch bezeichnet werden (Scheibe und Zanker (25)).

In der histochemischen Technik interessieren jedoch nur jene Veränderungen im Absorptionsspektrum eines Farbstoffes, die durch "Chromotrope" hervorgerufen werden. Im Rahmen der hier beschriebenen histochemischen Reaktion sind unter dem Begriff "Chromotrop" Polyelektrolyte mit einer hohen Ladungsdichte zu verstehen, wobei das Vorzeichen der Ladungen des Polyelektrolyten dem der Ladung des Farbstoffs entgegengesetzt ist. Zur Darstellung der Metachromasie sind praktisch nur kationische Farbstoffe, vor allem Thiazinfarbstoffe in Gebrauch, und von diesen werden Azur A und Toluidinblau am meisten verwandt (Kelly (14)). Die besonderen Vorzüge von Toluidinblau bestehen darin, daß das menschliche Auge im Spektralbereich der Absorptionsbanden dieses Farbstoffes besonders empfindlich ist und einen Farbwechsel von

blau nach rot bei Eintritt der metachromatischen Reaktion besonders gut erkennen kann (Scheibe und Zanker (25), Kelly (14)).

Am Beispiel von Toluidinblau soll zunächst das Verhalten eines metachromatischen Farbstoffs in wäßriger Lösung erläutert werden. (Ausführliche Darstellung bei Toepfer (30).) Hochverdünnte Lösungen zeigen eine Hauptbande, die sogenannte α -Bande, die der monomeren Form dieses Farbstoffes zugeordnet wird. (Vergleiche Abb.I). Mit steigender Konzentration entwickelt sich dann die β -Bande, die vorher praktisch nicht zu erkennen war und dem Farbstoffdimeren zugerechnet wird (Rabinowitch und Epstein (24)). Berechnungen von Rabinowitch und Epstein zeigen jedoch, daß die Thiazin-farbstoffe bereits in 10^{-7} m Konzentration dimerisiert vorliegen.

Dabei nimmt die α -Bande an Höhe ab. (Abb.I) Bei noch höherer Farbstoffkonzentration bilden sich Farbstoffpolymere, was mit dem Auftreten der sogenannten γ -Bande einhergeht. Diese Bande entsteht von der Position der β -Bande aus und verlagert sich bei steigender Farbstoffkonzentration kontinuierlich zur kurzwelligen Seite hin. Dabei wird ein rötlicher Farbton sichtbar. (Abb.I)

Es zeigt sich hiermit, daß eine Rotfärbung auch ohne die Wechselwirkung mit einem Chromotrop auftreten kann. Ob zwischen dieser "Konzentrationsmetachromasie" und der durch Chromotrop induzierten Metachromasie unterschieden werden muß, ist umstritten (Arnold (3), Graumann und Arnold (12), Toepfer (30), Scheibe und Zanker (25)). Bevor diese Frage weiter verfolgt werden kann, sollen zunächst einige von zahlreichen Theorien erläutert werden, die die Entstehung der Metachromasie zu deuten versuchen. (Übersicht bei Harms (13)).

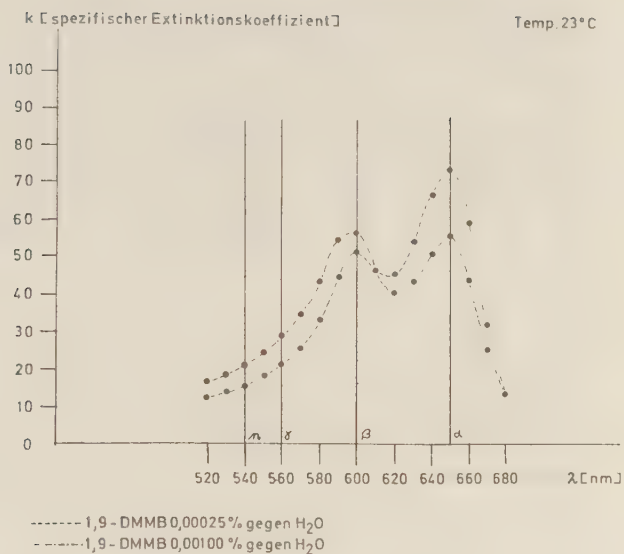


Abb. 1

Die Abbildung I zeigt die Abhängigkeit des spezifischen Extinktionskoeffizienten von der Konzentration der 1,9 Dimethylmethylenblau-Lösung. (Nähere Erläuterungen im Text Seite 19)

1. Mizellentheorie: (nach Booiij (6))

Nach dieser Theorie bilden die Farbstoffkationen in wäßriger Lösung durch Assoziation eine Mizelle, die sich wie eine neue absorbierende Einheit verhält. Ihre Entstehung wird durch Salze, hohe Farbstoffkonzentration und Chromotrope induziert. Dabei unterscheidet sich die Wirkung eines Chromotrops von der beider anderer Faktoren dadurch, daß sich die Mizelle an der Oberfläche des Polyelektrolyten bildet, von dem ein kolloidaler Zustand angenommen wird. Dadurch entsteht sofort eine starke Metachromasie, während in den beiden anderen Fällen die Mizellengröße und damit die Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen kontinuierlich zunimmt. Die bekannte Erscheinung, daß in hohen Chromotropkonzentrationen die metachromatische Reaktion wieder abnimmt, wird als Folge des konkurrierenden Verhaltens der Makromoleküle um die Farbstoffkationen und die daraus resultierende Abnahme der mittleren Mizellengröße gedeutet.

2. Bindungstheorie:

Metachromasie entsteht durch eine Überlappung der π -Elektronensysteme der Farbstoffmoleküle. Dabei muß der mittlere Abstand der Farbstoffmoleküle in der Größenordnung von 4-5 Å liegen. Dieser geringe Abstand kann jedoch nur durch eine Abschirmung der Coulombschen Ladungen erreicht werden, was durch die starken Wasserdipole in wäßriger Lösung oder durch die elektroadsorptive Bindung des Farbstoffs an einen Träger bewirkt

wird (Scheibe und Zanker (25)). Zur Entstehung der Metachromasie sind also zwei Schritte nötig: zunächst erfolgt die Bindung der Farbstoffmoleküle an den chromotropen Träger, dann setzt die Wechselwirkung der Farbstoffionen untereinander ein, indem die sogenannten Heitler-Londonschen Dispersionskräfte zur Wirkung kommen und eine schwache Bindung der Farbstoffmoleküle untereinander bewirken (Scheibe und Zanker (25), Sylvén (28)).

3. Woohsmann (34) diskutiert die Bildung einer Ein-schlußverbindung als Ursache der metachromatischen Reaktion: Durch einen Quellungsvorgang in metachromotropen Substanzen treten Hohlräume auf, in die sich Wasser, oder wegen der Affinität zu sauren Gruppen, der Farbstoff einlagern kann.

4. Pal und Basu (21) erklären die Metachromasie nach Untersuchungen an verschiedenen synthetischen Chromotropen folgendermaßen: Polyelektrolyte dissoziieren in wäßriger Lösung. Die zurückbleibenden gleichsinnigen Ladungen führen durch ihre gegenseitige Abstoßung dazu, daß das Makromolekül eine möglichst gestreckte Form einnimmt. Durch die Assoziation von Farbstoffionen an der entgegengesetzt geladenen Oberfläche des Chromotrops kommt es zur Ladungsneutralisation, das vorher gestreckte Makromolekül knäuelte sich zusammen, und es resultiert eine Abnahme der Viskosität, ebenso wie die Zugabe von Neutralsalz zu einer Polyelektrolytlösung die

Viskosität verringert. Durch die Zusammenknäuelung des Chromotrops kommen sich die Farbstoffmoleküle so nah, daß ein polymerisationsähnlicher Zustand entsteht, der den metachromatischen Effekt hervorruft. Mit dieser Theorie läßt sich auch die Abnahme der Metachromasie bei hohen Chromotropkonzentrationen erklären. Bei hohen Konzentrationen liegen die Makromoleküle bereits in einer mehr oder weniger geknäuelten Form vor, so daß die Assoziation der Farbstoffmoleküle infolge sterischer Behinderung nicht mehr stattfinden kann.

5. Erwähnt seien noch die polarisationsoptischen Untersuchungen von Missmahl (18). Missmahl konnte unter anderem zeigen, daß auch Ausstriche von Toluidinblaulösung auf einem Objektträger Metachromasie erkennen lassen, und daß sich die Rotfärbung von Agar-Schnitten und von gefärbten Leukozyten verstärkt, wenn mit dem Deckglas Druck auf sie ausgeübt wird. Die metachromatische Reaktion ist nach diesen Beobachtungen also an eine weitgehende Annäherung und Ausrichtung der Farbstoffmoleküle geknüpft. Dabei ändern sich Doppelbrechung, Absorption und Dichroismus der Farbstoffteilchen.

In welchem Maß diese Beobachtungen jedoch auf einer Wechselwirkung des Farbstoffs mit dem Polyelektrolyt Glas bzw. ausschließlich auf der von Missmahl geforderten Annäherung und Ausrichtung der Farbstoffteilchen beruhen, sei dahingestellt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß es bisher keine Theorie gibt, die alle Phänomene der Metachromasie eindeutig zu erklären gestattet. Insbesondere gibt es keine Deutung der metachromatischen Reaktion, die zwischen einer durch Chromotrope, durch Elektrolyte oder durch hohe Farbstoffkonzentrationen erzeugten Metachromasie streng unterscheidet. Danach wären Begriffe wie γ -Bande (= Absorptionsbande der polymeren Form des Farbstoffs) und μ -Bande (= Absorptionsbande der metachromatischen Form des Farbstoffs) also identisch. Toepfer (30) zeigt jedoch, daß zwischen γ -Bande und μ -Bande durchaus Unterschiede zu finden sind, die sich auf das Verhalten von α - und β -Bande, Alkoholresistenz, Reaktion bei hoher Konzentration an Chromotrop bzw. Salz und anderes mehr beziehen.

Chromotrope

Chromotrope sind Polyelektrolyte mit einer hohen Ladungsdichte, die in der Lage sind, Farbstoffionen zu assoziieren. Wegen des fast ausschließlichen Gebrauchs kationischer Farbstoffe läßt sich der Begriff Chromotrop im wesentlichen nur auf anionische Polyelektrolyte mit Sulfat-, Phosphat- oder Carboxylgruppen anwenden, wobei noch die Einschränkung gemacht werden muß, daß auch niedermolekulare Stoffe, wie anionische Detergentien (Levine und Schubert (17)) und kondensierte Phosphate vom Typ des Hexametaphosphat eine Metachromasie zeigen können (Drews (8), Toepfer (30), Wiame (32)). Durch die Anwendung von Störfaktoren, wie pH-Reihen, Salz-, Alkohol- und Harnstoffkonzentrationsreihen wurde verschiedentlich versucht, zwischen verschiedenen Kolloiden zu unterscheiden (Graumann und Arnold (12), Pal und Schubert (22)). Aus diesen Untersuchungen resultieren Begriffe wie "half plateau" Werte (Pal und Schubert (22)) und "Stärke der Metachromotropie" (Graumann und Arnold (12)). Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem quantitativen Verhältnis zwischen den Farbstoffmolekülen und den anionischen Gruppen des Chromotrops (Toepfer (30), Wiame (32) u.a.) und ergaben, daß die Farbstoffbindung für die Bestimmung der freien anionischen Gruppen eines Polyelektrolyten eine quantitative Reaktion ist (Szirmai und Balazs (29)).

Typische Chromotrope der Histochemie sind z.B. die Heparine, Chondroitinsulfate, Phospholipide, Mukopolysaccharide und die Hyaluronsäure. Die Metachromasie

der Nukleinsäuren ist hingegen umstritten (Drews (8), Kelly (14), Kramer und Windrum (16), Schubert und Hamermann (26), Sylvén (28), Toepfer (30), Wiame (32)).

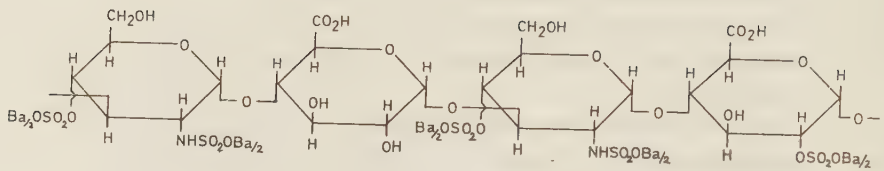
Darüber hinaus gibt es eine Fülle synthetischer, metachromatisch reagierender Polyelektrolyte, zu welchen auch die Gruppe der Heparinoide zu rechnen ist. Man versteht darunter Substanzen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, die durch physikochemische Eingriffe am Molekül eine dem Heparin ähnliche pharmakologische Wirkung erhalten haben.

Ein solches Heparinoid ist auch SP 54 (sulfatiertes Polyanion 1954), ein Pentosanpolysulfoester mit einem mittleren Molekulargewicht von 2000.

Da in dieser Arbeit nur die Struktur als anionischer Polyelektrolyt und die metachromotrope Eigenschaft dieser Substanz interessieren, seien die wesentlichsten pharmakologischen Eigenschaften: Fibrinolyse, Aktivierung der Lipoproteidlipase, Hemmung der Erythrozytenaggregation (Sludge) und Hyaluronidasehemmung nur kurz erwähnt. Eine umfangreiche Darstellung bietet die SP 54 Dokumentation von 1969 (27).

Ein Vergleich der für SP 54 veröffentlichten Strukturformel mit der Strukturformel des α -Heparins nach Wolf from (33) zeigt den höheren Sulfurierungsgrad von SP 54. Es enthält keinen Stickstoff, und die Pentoseringe sind jeweils 1-4 verknüpft. (Abb. II) Die von der Struktur her zu erwartende Metachromasie wurde von Müller und Wongphaet (19) bestätigt.

(a) α -Heparin



(b) SP.54

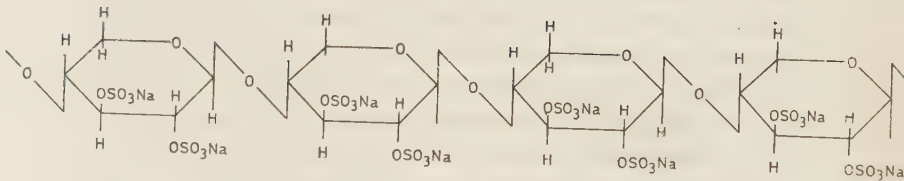


Abb. II a und b

Vergleich der Strukturformel des α -Heparins nach
 Wolfrom (33) mit der für SP 54 angegebenen
 Struktur (27).

Problemstellung

Abuchater (1), Beyerle (5), Dirks (7) und Kieser (15) untersuchten mit Hilfe der metachromatischen Reaktion gegenüber Toluidinblau die Tränenflüssigkeit, den Speichel, den Urin und die Faeces von Versuchspersonen auf eine Ausscheidung von SP 54 nach oraler und parenteraler Applikation. Die Metachromasie wurde entweder rein qualitativ, durch Beurteilung der Rotfärbung gegenüber einer Vergleichslösung (Abuchater, Beyerle und Dirks), oder quantitativ, durch spektralphotometrische Messung auf der Wellenlänge der α -Bande (Kieser) bestimmt. Mit Ausnahme der Faecesmessungen wurde in allen Fällen nach i.v.-Injektion eine positive Metachromasie-reaktion beobachtet, während nach oraler Gabe von SP 54 nur die Faeces positiv reagierten.

Die Wechselwirkung zwischen Chromotrop und Farbstoff als Grundlage der metachromatischen Reaktion wird jedoch von zahlreichen Störfaktoren beeinflusst. Eine falsch positive Reaktion kann durch Polymerisierungsercheinungen bei Variation der Farbstoff- oder Elektrolytkonzentration (Booij (6), Pal und Schubert (23), Rabinowitch und Epstein (24), Toepfer (30)), durch Ausrichtungs- und Schichtungsphänomene an Glasflächen (Missmahl (18)) und durch pH-Einflüsse vorgetäuscht werden. So bildet zum Beispiel Toluidinblau im alkalischen Bereich eine purpurfarbene Iminobase (Fautrez-Firlefyn (11)). Ebenso muß gesichert sein, daß im Untersuchungsmaterial eine

physiologische Ausscheidung chromotroper Substanzen nicht stattfindet.

Die metachromatische Reaktion wird durch zahlreiche Faktoren auch negativ beeinflusst, unter Umständen sogar völlig unterdrückt. Hier sind wiederum Elektrolyt- und pH-Einflüsse zu nennen (Appel und Scheibe (2), Arnold (3), Bank und Bungenberg De Jong (4), Graumann und Arnold (12), Kelly (14), Pal und Schubert (23), Szirmai und Balazs (29), Toepfer (30)). Harnstoff (Mukerjee und Ghosh (20), Pal und Schubert (22)) beeinträchtigt die Metachromasie ebenso wie Alkohol (Graumann und Arnold (12), Pal und Schubert (22) und (23), Toepfer (30) und (31)); Chromotropüberschuß (Booiij (6), Pal und Schubert (22), Rabinowitch und Epstein (24)), hohe Temperaturen und Proteine wirken in der gleichen Richtung (Kelly (14)).

Der genaue Angriffspunkt dieser Störfaktoren ist jedoch noch relativ unbekannt, was an einem Beispiel erläutert werden soll. Während die Wirkung einer alkoholischen Lösung allgemein auf die Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante zurückgeführt wird, was durch Tieftemperaturmessungen von Zanker (35) nahezu bewiesen ist, so fällt es doch auf, daß Harnstoff fast die gleichen spektralen Veränderungen bewirkt, obwohl er die DK einer wäßrigen Lösung erhöht (Mukerjee und Ghosh (20), Pal und Schubert (22)). Die Wirkung von Salzen wird als Folge der Konkurrenzreaktion zwischen Salz- und Farbstoffkationen um die anionischen Stellen am chromotropen Träger gedeutet. In diese Richtung weisen auch Untersuchungen von Arnold (3), von Bank und Bungenberg De Jong (4),

die eine geringe Wirkung von Anionen auf die Störfähigkeit eines Salzes zeigten. Bank und Bungenberg De Jong (4) nehmen an, daß auch die Unterdrückung der Metachromasie bei Chromotrop-überschuß auf die Wirkung der anorganischen Kationen zurückzuführen ist. Für die Beeinflussung der metachromatischen Reaktion durch Proteine gibt Kelly (14) drei mögliche Wirkungsmechanismen an. (1.) Kationische Gruppen der Proteine wirken im gleichen Sinne wie Salzkationen, (2.) zwischen Chromotrop und OH-Gruppen der Proteine bilden sich kovalente Bindungen aus und (3.) eine sterische Maskierung durch die Proteine tritt ein. Nach diesen Angaben ist es verständlich, daß besonders bei der Untersuchung von Sekreten und Exkreten mit ihrer komplexen, sich qualitativ und vor allem quantitativ ständig ändernden Zusammensetzung, die Beurteilung einer metachromatischen Reaktion sehr schwierig ist. Sinn dieser Arbeit sollte es nun sein, die durch SP 54 hervorgerufene Metachromasie und den Einfluß verschiedener Störfaktoren näher zu untersuchen. Als Störfaktoren wurden gewählt:

1. verschiedene Elektrolytlösungen in abgestuften Konzentrationen,
2. menschlicher Handschweiß als biologische Modellsubstanz.

Dabei bot sich 1,9 Dimethylmethylenblau (1,9 DMMB), ein in der histochemischen Technik relativ neuer Farbstoff in besonderer Weise an. Toepfer (30) und (31) fand für 1,9 DMMB mit Heparin und Hexameta-

der metachromatischen Reaktion gegenüber höchsten Elektrolytkonzentrationen. Ebenso zeigte sich dieser Farbstoff unempfindlich gegenüber Änderungen des pH-Wertes. Dieses Verhalten ist bisher von keinem anderen Thiazinfarbstoff bekannt. (Abb.III)

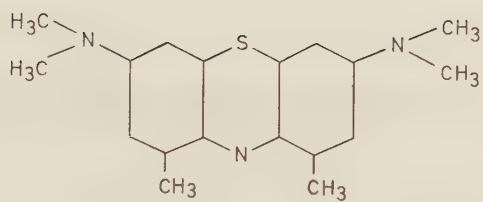


Abb. III

Strukturformel des 1,9-Dimethylmethylenblaus nach
Toepfer (30).

E i g e n e V e r s u c h e

Material und Methode

1. Messung der Absorptionsspektren:

Die Extinktionswerte wurden mit dem Zeiss Spektral-photometer PMQ 2 im Bereich von 520-680 nm jeweils im Abstand von 10 nm gemessen. Die Schichtdicke der benutzten Quarzküvetten betrug 10 mm.

2. Farbstoff:

Als Farbstoff diente 1,9-Dimethylmethylenblau puriss. (Serva), Chargennummer 20335 mit λ max. von 650 nm. Da alle Meßansätze jeweils die gleiche Farbstoffkonzentration hatten, wurde die Darstellung E gegen λ gewählt und auf die Umrechnung nach ϵ =molarer Extinktionskoeffizient verzichtet. In Vorversuchen, die im weiteren Text noch näher beschrieben werden, wurde eine 0,0005 % 1,9-DMMB-Lösung als optimale Farbstoffkonzentration bestimmt und für alle Messungen in der Salzkonzentrationsreihe, für alle Schweißmessungen und Messungen an Seifenlösungen benutzt.

3. Chromotrop:

Als Chromotrop diente das kommerzielle Präparat SP 54 der Firma Benechemie München, das als

Natriumsalz eines Pentosanpolysulfoesters mit dem mittleren Molekulargewicht von 2000 in wäßriger Lösung im Handel ist. (Konzentrationsangaben im Text und in den Bildunterschriften).

4. Salze:

Für die Salzkonzentrationsreihen wurden die Salze NaCl , NaH_2PO_4 , CaCl_2 und K_2SO_4 p.a. von der Firma Merck in Konzentrationen von 0,01 n, 0,1 n und 1 n verwandt. K_2SO_4 wurde nur in 0,01 n und 0,1 n Konzentration untersucht. Folgende Messungen wurden durchgeführt:

1. Salze ohne Chromotrop

2. Salze mit Chromotropabstufungen

5. Messungen im menschlichen Handschweiß:

Der Handschweiß wurde nach gründlicher Reinigung der Hände (die Hände wurden 2 Minuten mit einer Feinseife (Rexona) gewaschen und anschließend 3 Minuten lang mit klarem Wasser abgespült) in Plastikbeuteln gesammelt und durch ein Membranfilter ultrafiltriert. Die in den ersten 30 Minuten gewonnene Menge wurde verworfen. Probanden waren 15 Personen männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter zwischen 21 und 62 Jahren. Die Versuche erfolgten bei Zimmertemperatur, auf eine mögliche Erhöhung der Schweißflußrate durch Hidrotika oder heiße Getränke wurde verzichtet. Mit dem Handschweiß

wurden folgende Versuche ausgeführt:

1. Messung gegen H_2O
2. " Schweiß + 1,9-DMMB gegen H_2O
3. Versuche mit einem Ionenaustauscher:
Handsweiß wurde mit einem Anionenaustauscher versetzt, 3 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und nochmals ultrafiltriert. Danach wurde das Absorptionsspektrum mit 1,9-DMMB gegen H_2O gemessen.
4. Versuche mit SP 54:
5 μ l einer SP 54-Verdünnung wurden in Schweiß gelöst. Als Vergleichswert wurde die gleiche Menge derselben Schweißprobe mit 5 μ l H_2O versetzt und das Absorptionsspektrum beider Lösungen mit 1,9-DMMB gegen H_2O aufgezeichnet.

6. Messungen an Seifenlösungen:

Eine Aufschwemmung der zur Reinigung der Hände benutzten Feinseife in aqua bidest. wurde viermal ultrafiltriert, die erhaltene Stammlösung wurde mit aqua bidest. im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:10, 1:50 und 1:100 verdünnt, und für folgende Meßansätze wurden die Extinktionswerte zwischen 520 und 680 nm bestimmt:

1. 0,2 ml Seifenlösung + 0,3 ml H_2O gegen H_2O
2. 0,2 ml " + 0,3 ml 1,9 DMMB gegen H_2O
3. $\triangle$ E

7. Statistische Verfahren zur Auswertung der Meßwerte

- A Die Meßergebnisse wurden in Tabellen aufgeführt. Bei den Versuchen mit Variation der Salzkonzentration wurden die Meßwerte nur für die Wellenlängen 540 nm, 600 nm und 650 nm = μ -, β -, und α -Bande angegeben.
- B Es wurden Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler der Mittelwerte pro Meßbedingung mittels nachstehender Formel berechnet.
- C Darstellung der Ergebnisse in Graphiken.

Die Ergebnisse der Schweißmessungen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. In der Salzkonzentrationsreihe wurde die Extinktion bei 540 nm, 600 nm und 650 nm jeweils viermal bestimmt, ebenso bei den Messungen an den Seifenlösungen.

Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}}$$

Standardfehler des Mittelwertes:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Zur Wahl der Farbstoffkonzentration

Die Bedeutung der Farbstoffkonzentration für die Beurteilung einer metachromatischen Reaktion wurde bereits erwähnt. Bei den metachromatischen Thiazinfarbstoffen muß außerdem die Tendenz zur Ausfällung bei hohen Konzentrationen an Farbstoff und Chromotrop beachtet werden, was in besonderem Maß für die Anwendung spektralphotometrischer Untersuchungen gilt.

Es wurde daher zunächst eine wäßrige Lösung von 1,9 DMMB in folgenden Konzentrationen hergestellt: 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0005%. SP 54 (100mg/ml) wurde in aqua bidest. 1:1000, 1:10000, 1:50000, 1:100000, 1:200000, 1:500000 und 1:1000000 verdünnt und mit jeder Konzentrationsstufe von 1,9 DMMB im Verhältnis 1:1 im Reagenzglas versetzt. Die metachromatische Reaktion wurde gegenüber einer Vergleichslösung auf einer weißen Unterlage beurteilt. (Tab.I)

In dieser Versuchsreihe zeigte sich die 0,005% Farbstofflösung am geeignetsten. Bei einer SP 54-Verdünnung von 1:200000 fiel die metachromatische Reaktion sicher positiv aus, eine Verdünnung von 1:500000 war noch fraglich positiv zu bewerten. Auch bei mehrstündigem Stehen konnte man im Reagenzglas makroskopisch keine Ausfällung erkennen. 0,1% und 0,01% Farbstofflösungen zeigten dagegen vor allem bei höheren SP 54-Konzentrationen Fällungsreaktionen, niedrige SP 54-Konzentrationen wurden durch den Überschuß an 1,9 DMMB verdeckt. Bei einer SP 54-Verdünnung von 1:1000000 ($1 \cdot 10^{-4}$ mg/ml) ließ sich in keinem Fall eine positive Metachromasiereaktion feststellen. 0,0005 %

1,9 DMMB-Lösung wurde aus den eben genannten Gründen für alle Messungen in der Salzkonzentrationsreihe und für alle Schweißmessungen und Messungen an Seifenlösungen verwendet.

Tabelle I:

Substratkonzentrationen der SP 54-Verdünnungsreihe

Verdünnung	Konzentration	
unverdünnt	100,0000mg/ml	$1 \cdot 10^2$ mg/ml
1: 1000	0,1000mg/ml	$1 \cdot 10^{-1}$ mg/ml
1: 10000	0,0100mg/ml	$1 \cdot 10^{-2}$ mg/ml
1: 50000	0,0020mg/ml	$2 \cdot 10^{-3}$ mg/ml
1: 100000	0,0010mg/ml	$1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml
1: 200000	0,0005mg/ml	$5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml
1: 500000	0,0002mg/ml	$2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml
1:1000000	0,0001mg/ml	$1 \cdot 10^{-4}$ mg/ml

Ergebnisse

Die Absorptionsbanden von 1,9 DMMB

Abb. (I) zeigt die Absorptionsbanden von 1,9 DMMB bei zwei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. Man erkennt bei der 0,00025% Lösung die Hauptbande (α -Bande) bei 650 nm und eine zweite Bande (β -Bande) bei 600 nm. Nach der kurzwelligen Seite hin läuft die Kurve langsam aus, ohne eine neue Bande erkennen zu lassen. Bei einer 0,001% Farbstofflösung ändert sich das Spektrum beträchtlich, die β -Bande nimmt an Höhe zu und überragt die nun abgesunkene α -Bande. Auf der kurzwelligen Seite ist der gesamte Kurvenverlauf zu höheren Extinktions- bzw. k-Werten hin verschoben, das Lambert-Beersche Gesetz wird nicht erfüllt. Die Deutung dieser konzentrationsbedingten spektralen Veränderungen als Dimerisierungs- und Polymerisierungseffekt wurde bereits erwähnt. Wenn man die metachromatische Reaktion als polymerisierungsähnlichen Vorgang im weitesten Sinne ansieht, ist zu erwarten, daß auch hier das Beersche Gesetz $E = \epsilon \cdot c \cdot d^{(X)}$ nicht gilt. Eine Untersuchung verschiedener SP 54-Konzentrationen zeigt dies deutlich. (Tab.II)

(X) E = Extinktion

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration (Mol/l)

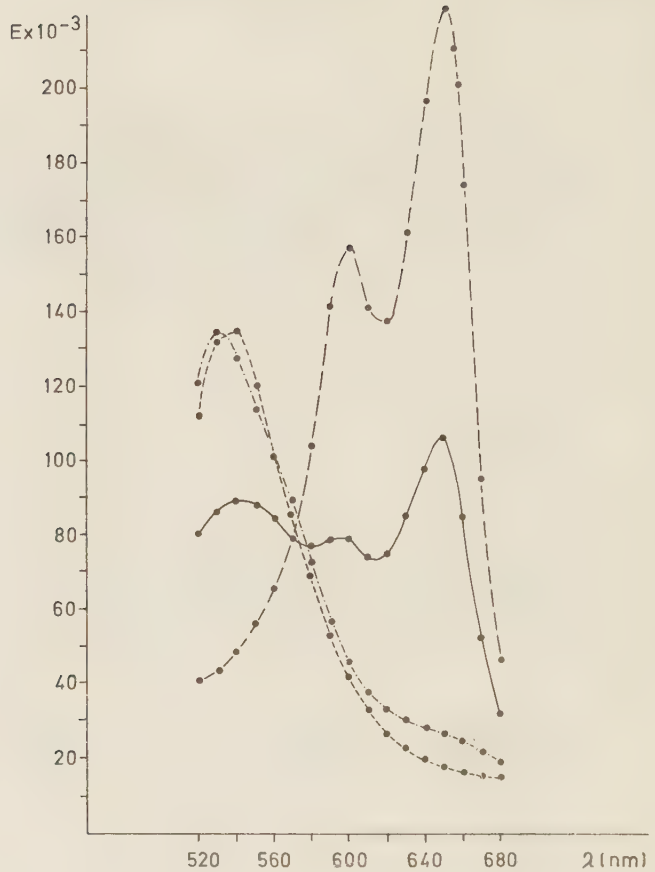
d = Schichtdicke

Diese Tabelle zeigt auch, daß mit steigender Chromotropkonzentration der metachromatische Effekt wieder abnimmt, was an dem Wiederanstieg der α -Bande und der Abnahme der metachromatischen Bande (μ -Bande) zu erkennen ist. (Abb. IV)

Tabelle II:

Extinktionswerte der α - und μ -Bande von 1,9 DMMB bei verschiedenen SP 54 Konzentrationen. (0,2ml SP-Verdünnung + 0,3ml DMMB 0,0005%)

Verdünnung	650 nm	540 nm	Quotient $E_{\mu}:E_{\alpha}$
1: ∞	221	49	0,221
1:500000	208	60	0,288
1:200000	184	74	0,402
1:100000	106	89	0,839
1: 10000	20	127	6,350
1: 1000	18	134	7,444
1: 100	22	133	6,045
1: 10	27	128	4,740



pH 4,5 ——— Leerwert
 pH 4,5 - - - - 0,2 ml SP 54 1:1000 + 0,3 ml 1,9-DMMB 0,0005%
 pH 5,1 - · - · 0,2 ml SP 54 1:10 + 0,3 ml 1,9-DMMB 0,0005%
 pH 4,4 ——— 0,2 ml SP 54 1:100000 + 0,3 ml 1,9-DMMB 0,0005%

Abb. IV

Die Abbildung IV zeigt den Einfluß verschiedener SP 54-Konzentrationen auf das Spektrum einer 0,0005 % 1,9-DMMB-Lösung. Dabei fällt auf, daß bei der höchsten SP 54-Konzentration (=Verdünnung 1:10) bereits wieder eine deutliche Anhebung der α -Bande eintritt.

Mit steigender SP 54-Konzentration sinkt die α -Bande auf extrem niedrige Werte, dabei entsteht bei 540 nm eine neue Bande, die metachromatische oder μ -Bande mit einer leuchtend roten Farbe. Es fällt auf, daß SP 54 die gleiche Lage der metachromatischen Bande wie Heparin hat (Toepfer (30)), obwohl es sich in Molekulargewicht und (wegen der höheren Anzahl an Sulfatgruppen) wahrscheinlich auch in der Ladungsdichte erheblich vom Heparin unterscheidet.

Quantitativ läßt sich die metachromatische Reaktion besonders durch den Quotienten $E_{\mu}:E_{\alpha}$ (Tab.II) beurteilen. Danach müßte das Optimum der stöchiometrischen Umsetzung zwischen Chromotrop und Farbstoff zwischen einer 1:10000 - und einer 1:100-fachen SP 54-Verdünnung liegen, was jedoch nicht näher untersucht wurde. Mit Hilfe der gewählten Versuchsanordnung läßt sich SP 54 in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml noch sicher nachweisen.

Wirkung von Elektrolyten

Um eine Aussage zu erhalten, ob sich die Bedingungen zum quantitativen und qualitativen metachromatischen Nachweis von SP 54 durch den Einfluß von Elektrolyten verändern, wurde die Wirkung von NaCl, K_2SO_4 , $CaCl_2$ und NaH_2PO_4 auf DMMB und auf das Farbstoff-Chromotrop-System untersucht. Die statistische Auswertung mußte sich aus mathematischen Gründen auf einige Punkte des Kurvenverlaufes beschränken, wobei nicht berücksichtigt werden konnte, daß die verschiedenen Salze ihre polymere Bande bei verschiedenen Wellenlängen haben. Da jedoch nicht mit gesättigten Salzlösungen gearbeitet wurde, und da die Wirkung auf die Metachromasie die eigentliche Fragestellung war, erscheint ein alleiniger Vergleich der Extinktionswerte der α - β - und μ -Bande gerechtfertigt. Um die mögliche Wirkung von pH-Einflüssen ausschließen zu können, wurde jeweils im Meßansatz (0,2 ml Probe + 0,3 ml 1,9 DMMB) der pH-Wert bestimmt. (Tab. III)

Alle untersuchten Salze wirken gleichsinnig auf die α -Bande. Sie nimmt stark an Höhe ab, am meisten bei NaCl und $CaCl_2$ (von 221 auf 151,5 bzw. 153,3). Die Wirkung der verschiedenen Salze ist quantitativ durchaus nicht gleich. So steigt die μ -Bande nur bei K_2SO_4 und NaH_2PO_4 deutlich an, was aber eventuell durch die Lagebeziehung zwischen polymerer und μ -Bande erklärt werden kann (Lage der Absorptionsmaxima von 1,9 DMMB in gesättigten Salzlösungen bei Toepfer (30): NaH_2PO_4 550 nm, NaCl 525 nm, $CaCl_2$ 532 nm.)

Tabelle III Einfluß von Elektrolyten auf die
Extinktionswerte der drei Hauptbanden einer

Salzkonzentration (Normalität)	Salz	0,0005% 1,9-Dimethylmethylenblaulösung.								
		650 nm			600 nm			540 nm		
		α -Bande			β -Bande			M -Bande		
(n)		$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
0,00	NaH ₂ PO ₄	221,0	4,2	2,1	157,3	5,1	2,5	49,0	1,6	0,8
0,01		223,8	3,2	1,6	164,3	4,5	2,3	50,5	4,5	2,3
0,10		211,3	5,8	2,9	163,0	6,7	3,4	52,0	3,2	1,6
1,00		193,8	2,6	1,3	165,8	2,2	1,1	56,0	4,1	2,0
0,00	CaCl ₂	221,0	4,2	2,1	157,3	5,1	2,5	49,0	1,6	0,8
0,01		207,5	2,6	1,3	149,5	3,4	1,7	49,5	3,3	1,7
0,10		189,5	1,9	1,0	151,3	2,6	1,3	50,3	2,2	1,1
1,00		153,3	4,3	2,2	137,5	4,1	2,1	53,3	3,8	1,9
0,00	NaCl	221,0	4,2	2,1	157,3	5,1	2,5	49,0	1,6	0,8
0,01		215,8	3,6	1,8	161,5	5,9	3,0	48,8	3,6	1,8
0,10		198,0	2,2	1,1	158,0	3,3	1,6	50,3	3,2	1,6
1,00		151,5	1,0	0,5	143,8	2,1	1,0	54,8	2,8	1,4
0,00	K ₂ SO ₄	221,0	4,2	2,1	157,3	5,1	2,5	49,0	1,6	0,8
0,01		219,3	2,2	1,1	166,0	3,5	1,7	51,8	4,0	2,0
0,10		203,0	4,9	2,5	163,8	4,6	2,3	58,3	4,4	2,2

$\bar{x}$ = Mittelwert von E ($\cdot 10^{-3}$)

(Mittel aus vier Meßwerten)

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung Mw.

Wenn man zwei Methoden zur spektralphotometrischen Beurteilung der Metachromasie vergleicht, (1.) die Messung der positiven Metachromasie (Bestimmung der Extinktion der M -Bande) und (2.) die Messung der negativen Metachromasie (Bestimmung der Abnahme der Extinktion der α -Bande), dann zeigt die Tabelle III, daß eine alleinige Anwendung der zweiten Methode unter Umständen erhebliche Fehler beinhalten kann. Elektrolyte können die α -Bande stark erniedrigen und somit eine metachromatische Reaktion vortäuschen, wenn als Maß für die Metachromasie nur die Senkung der α -Bande mit der Eichkurve aus einer Chromotropkonzentrationsreihe verglichen wird.

Wechselwirkung zwischen Chromotrop und Elektrolyten

Eine besondere Bedeutung hat die Frage, in welchem Maß Elektrolyte die metachromatische Reaktion beeinflussen. Grundsätzlich sind drei Möglichkeiten gegeben: 1. die metachromatische Reaktion wird nicht beeinflusst, 2. Elektrolyte und Chromotrop wirken additiv, 3. Elektrolyte und Chromotrop wirken antagonistisch. Unter Umständen ist es wegen der komplexen Reaktionsweise sogar denkbar, daß in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden Partner auch mehrere dieser Reaktionsmöglichkeiten nebeneinander eintreten können.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Wirkung 0,01n, 0,1n, und 1n Elektrolytlösungen auf SP 54-Verdünnungen von 1:1000, 1:10000 und 1:100000 untersucht.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

(Tab.IV, siehe auch Abb.V)

Auch hier wirken alle Salze gleichsinnig aber quantitativ unterschiedlich. Die α - und β -Bande steigen im Gegensatz zu den Messungen ohne Chromotrop mit zunehmender Salzkonzentration an, die μ -Bande nimmt an Höhe ab, was im Sinne der Zerstörung der Metachromasie zu deuten ist (Abb.VI).

CaCl_2 zeigt in allen SP 54 Konzentrationen den stärksten Störeffekt, was offenbar auf die Zweiwertigkeit von Ca^{++} zurückzuführen ist (Arnold (3), Bank und Bungenberg De Jong (4)). Bei einer hohen Chromotropkonzentration (SP 54 1:1000) ist in allen Fällen die Abnahme der μ -Bande die empfindlichere Reaktion. Bei CaCl_2 und NaCl bewirkt bereits eine 0,01n Salzlösung, bei K_2SO_4 und NaH_2PO_4 eine 0,1n Salzlösung eine Abnahme der μ -Bande. Ein deutlicher Anstieg der α -Bande hingegen ist bei CaCl_2 erst bei einer 0,1n Lösung, bei NaCl bei einer 1n Salzlösung zu sehen, während er bei K_2SO_4 und NaH_2PO_4 in keiner Konzentrationsstufe auftritt. Auffällig sind die Ergebnisse, die mit der niedrigsten SP 54-Konzentration erzielt wurden.

Bei allen Salzen steigt hier die α -Bande zunächst an, sinkt dann aber wieder ab (bei NaCl und K_2SO_4 signifikant), während die β -Bande ansteigt und die μ -Bande absinkt. Bei der Entstehung der Metachromasie nehmen α - und β -Bande an Höhe ab (Booij (6), Toepfer (30)), bei der Zerstörung müßten sie folglich gemeinsam wieder ansteigen, was im Falle der SP 54-Verdünnung 1:100000 jedoch nicht

Tabelle IVa Einfluß von Elektrolyten auf das Farbstoff-Chromotrop-System (SP 54 + 1,9 DMMB) bei den drei Hauptbanden von 1,9 DMMB.

Wellenlänge (λ)	Salzkonzentration (Normalität)	Salz								
		SP 1:100000			SP 1:10000			SP 1:1000		
	(n)	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
650 nm	0,00	105,5	3,9	1,9	19,8	1,7	0,9	18,3	1,0	0,5
	0,01	130,8	1,9	1,0	20,3	1,7	0,9	22,0	0,8	0,4
	0,10	135,0	4,7	2,4	22,0	3,4	1,7	21,5	1,9	1,0
	1,00	129,3	2,5	1,3	30,0	1,4	0,7	23,5	1,3	0,7
600 nm	0,00	78,8	4,1	2,1	39,0	1,4	0,7	42,0	2,9	1,5
	0,01	94,0	4,4	2,2	38,8	2,6	1,3	43,8	2,5	1,3
	0,10	99,3	4,6	2,3	42,8	3,4	1,7	43,0	1,2	0,6
	1,00	105,0	0,8	0,4	48,8	1,0	0,5	43,5	2,6	1,3
540 nm	0,00	88,8	2,8	1,4	126,5	4,0	2,0	134,0	2,9	1,5
	0,01	82,5	5,2	2,6	123,5	2,0	1,0	133,3	2,2	1,1
	0,10	82,5	4,2	2,1	122,8	3,3	1,7	122,8	1,0	0,5
	1,00	84,5	1,9	1,0	116,0	1,4	0,7	115,3	2,8	1,4
650 nm	0,00	105,5	3,9	1,9	19,8	1,7	0,9	18,3	1,0	0,5
	0,01	113,0	2,9	1,5	22,5	3,4	1,7	20,8	1,5	0,8
	0,10	123,0	2,6	1,3	33,0	2,9	1,5	26,3	4,1	2,1
	1,00	117,3	3,9	1,9	57,3	1,0	0,5	36,3	6,2	3,1
600 nm	0,00	78,8	4,1	2,1	39,0	1,4	0,7	42,0	2,9	1,5
	0,01	80,3	4,2	2,1	37,5	3,7	1,9	42,0	1,4	0,7
	0,10	92,8	2,6	1,3	44,5	3,7	1,9	46,0	4,6	2,3
	1,00	101,8	5,8	2,9	59,3	1,7	0,9	49,3	6,7	3,4
540 nm	0,00	88,8	2,8	1,4	126,5	4,0	2,0	134,0	2,9	1,5
	0,01	79,5	3,9	1,9	107,0	4,0	2,0	112,8	2,2	1,1
	0,10	78,5	2,4	1,2	105,0	3,5	1,7	112,0	3,7	1,9
	1,00	67,5	4,1	2,1	96,8	1,0	0,5	106,3	7,1	3,5

Tabelle IVb Einfluß von Elektrolyten auf das Farbstoff-Chromotrop-System (SP 54 + 1,9 DMMB) bei den drei Hauptbanden von 1,9 DMMB.

Wellenlänge (λ)	Salzkonzentration (Normalität)	Salz									
			SP 1:100000			SP 1:10000			SP 1:1000		
	(n)		$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
650 nm	0,00		105,5	3,9	1,9	19,8	1,7	0,9	18,3	1,0	0,5
	0,01		115,8	5,6	2,8	18,5	1,7	0,9	18,3	1,9	1,0
	0,10		114,3	4,6	2,3	25,3	3,0	1,5	21,8	3,0	1,5
	1,00		103,3	1,9	1,0	43,8	3,3	1,7	32,3	1,7	0,9
600 nm	0,00	NaCl	78,8	4,1	2,1	39,0	1,4	0,7	42,0	2,9	1,5
	0,01		85,3	5,7	2,9	36,8	3,2	1,6	39,3	3,2	1,6
	0,10		87,8	4,7	2,4	44,3	3,9	1,9	42,5	4,2	2,1
	1,00		91,5	1,7	0,9	53,5	4,0	2,0	47,8	3,4	1,7
540 nm	0,00		88,8	2,8	1,4	126,5	4,0	2,0	134,0	2,9	1,5
	0,01		87,5	3,9	1,9	117,5	3,7	1,9	125,5	1,7	0,9
	0,10		85,0	3,4	1,7	118,8	4,6	2,3	119,0	4,3	2,2
	1,00		72,8	1,9	1,0	104,8	3,6	1,8	109,8	3,4	1,7
650 nm	0,00		105,5	3,9	1,9	19,8	1,7	0,9	18,3	1,0	0,5
	0,01		132,8	2,2	1,1	21,3	3,8	1,9	20,3	2,8	1,4
	0,10		122,8	4,6	2,3	28,5	1,7	0,9	24,8	3,0	1,5
600 nm	0,00	K ₂ SO ₄	78,8	4,1	2,1	39,0	1,4	0,7	42,0	2,9	1,5
	0,01		97,5	3,0	1,5	45,8	5,1	2,6	45,3	2,8	1,4
	0,10		97,8	4,9	2,5	51,0	3,5	1,7	47,3	4,4	2,2
540 nm	0,00		88,8	2,8	1,4	126,5	4,0	2,0	134,0	2,9	1,5
	0,01		87,8	3,3	1,7	125,0	4,7	2,3	127,8	2,2	1,1
	0,10		88,3	4,4	2,2	123,5	2,7	1,3	122,8	3,4	1,7

$\bar{x}$ =Mittelwert von $E(\cdot 10^{-3})$ (Mittelwert aus vier Messungen)

s=Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ =Standardabweichung Mw.

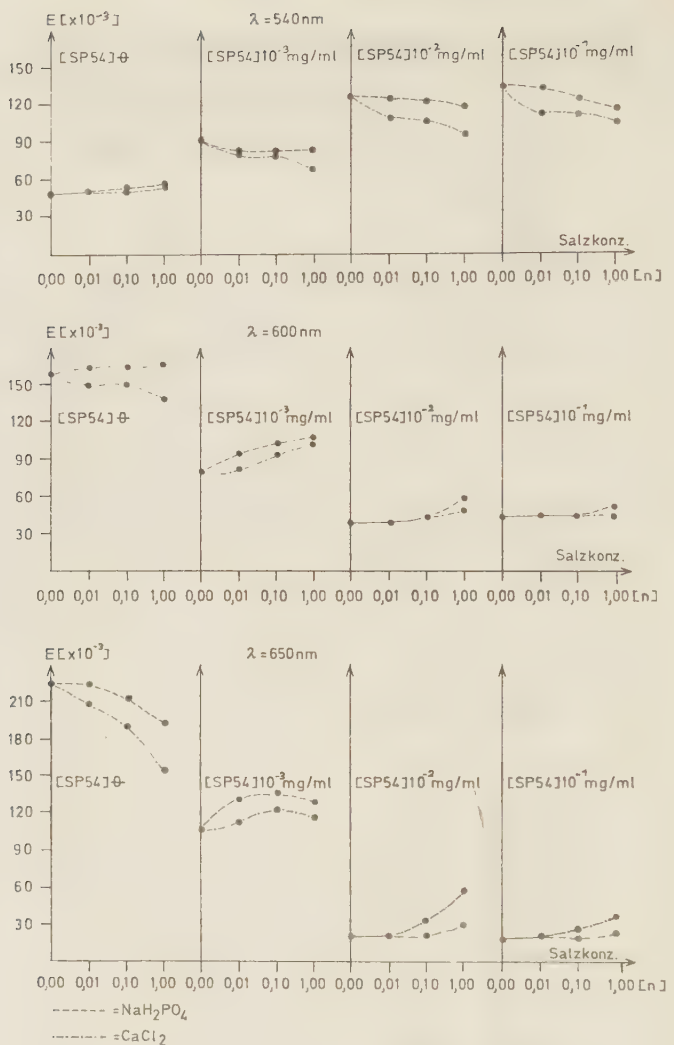


Abb. Va

Die Abbildungen V a und b zeigen die Werte der Tabellen IV a und b (Einfluß von Elektrolyten auf das Farbstoff-Chromotrop-System: SP 54 + 1,9 DMMB) bei den drei Hauptbanden von 1,9 DMMB in graphischer Darstellung. Erläuterungen im Text Seite 23 bis 25.

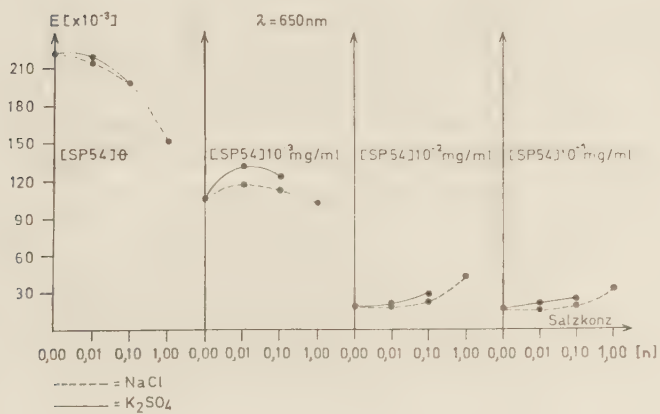
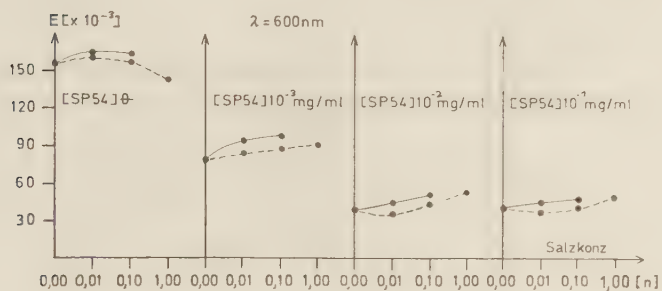
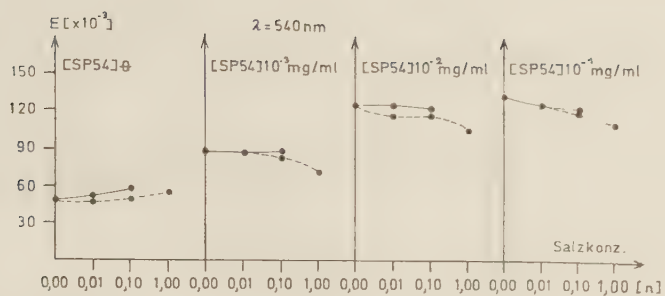
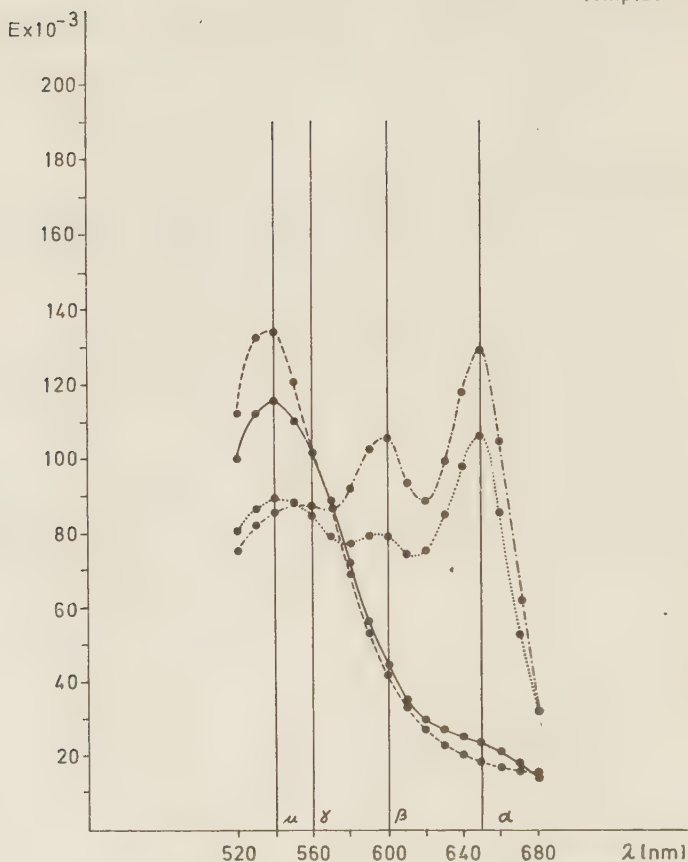


Abb. Vb



pH 4,5-----0,2ml SP54 1:1000+0,3ml 1,9-DMMB
 pH 4,4———0,2ml SP54 1:1000 in 1n NaH₂PO₄+0,3ml DMMB
 pH 4,4.....0,2ml SP54 1:100000+0,3ml 1,9-DMMB
 pH 4,3-.-.-0,2ml SP54 1:100000 in 1n NaH₂PO₄+0,3ml DMMB

Abb. VI

Die Abbildung VI zeigt deutlich den negativen Einfluß von Elektrolyten (in diesem Fall von NaH₂PO₄) auf die durch SP 54 hervorgerufenen Veränderungen im Spektrum einer 1,9 DMMB-Lösung: die μ -Bande wird gesenkt, die α - und die β -Bande werden je nach SP 54-Konzentration mehr oder weniger angehoben.

eintritt. Eine Deutung für diesen Befund kann leider nicht gegeben werden.

Mittelwertskurven

Von den drei Meßgrößen: Wellenlänge (λ), SP 54-Konzentration und Salzkonzentration wurde jeweils eine Größe über alle Meßbedingungen gemittelt. Das daraus resultierende Schaubild der Wechselwirkung zwischen jeweils 2 Größen wurde aufgezeichnet (Abb.VII). Auf die Wiedergabe der Abbildung mit Mittelung der Wellenlänge wurde verzichtet, da wegen den unterschiedlichen, zum Teil gleichsinnigen, zum Teil gegensinnigen Einflüssen von SP 54 bzw. Salz (oder deren Kombination) auf die Extinktion bei den einzelnen Wellenlängen ein kaum zu interpretierendes Schaubild entsteht. Die Abb. VII a. u. b. zeigen die quantitativ sehr unterschiedlichen Wirkungen von Salzen und SP 54 auf den Kurvenverlauf, so daß insbesondere in der Abb. VIIa nur die steigende oder fallende Tendenz im Kurvenverlauf beurteilt werden kann. Die fallende Tendenz der 540 nm-Bande läßt sich nur dadurch so einfach und im Sinne der Zerstörung der Metachromasie interpretieren, weil im untersuchten Konzentrationsbereich die Wirkung der Salze allein auf den Farbstoff minimal ist. Dagegen führt die bei der 650 nm-Bande sehr ausgeprägte Elektrolytwirkung (vor allem ohne SP 54 Zugabe) zu einem inhomogenen Kurvenverlauf mit zunächst

ansteigender und dann abfallender Tendenz. Abb VIIb zeigt den überragenden Einfluß der einzelnen SP 54 Konzentrationen auf den Kurvenverlauf, dennoch wird auch hier bei einem Vergleich der Höhe der einzelnen Meßpunkte auf der y-Achse insbesondere der quantitativ sehr unterschiedliche Einfluß der verschiedenen Salze recht deutlich.

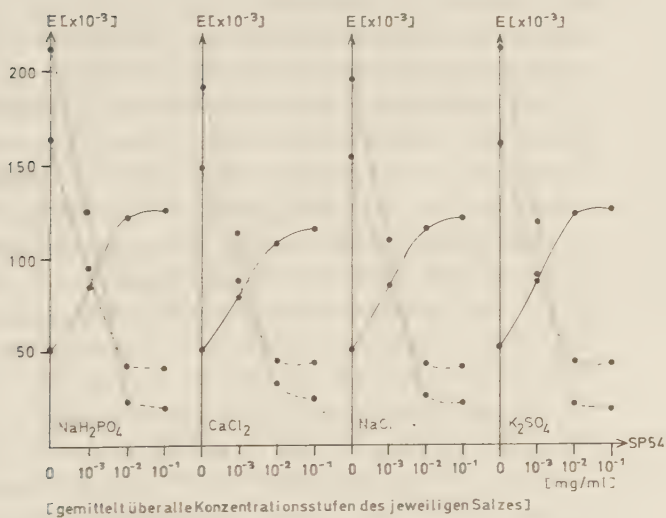
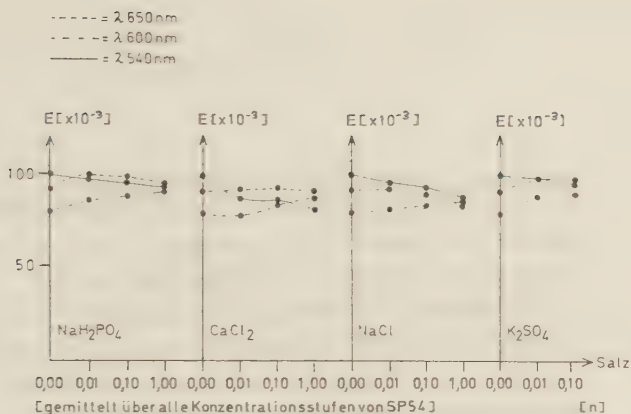


Abb. VII

Durch Mittelung einer Größe über alle Meßbedingungen wurden bei den Größen λ , SP 54-Konzentration und Elektrolyt-Konzentration die Werte für die zweifachen Wechselwirkungen errechnet und graphisch dargestellt. (Nähere Erläuterungen im Text Seite 25 und

Messungen im menschlichen Handschweiß

Während Abuchater (1) im Schweiß keine meta-chromatische Reaktion feststellen konnte, zeigten eigene Untersuchungen an Schweißproben eine deutliche rotviolette Verfärbung gegenüber einer Vergleichslösung. Diese Erscheinung sollte näher untersucht werden, wobei zunächst die Gewinnung der Schweißproben das Hauptproblem darstellte. Von den gebräuchlichen Methoden: Pilocarpinontophorese, intracutane Pilocarpininjektion, Parafangopackung, Gewinnung unter Paraffinöl und Plastikbeutelmethode (Zellmer (36), Emrich und Ullrich (10)), wurde die letzte wegen ihrer einfachen Anwendung gewählt. Mit dieser Methode konnten bei einer Versuchsperson innerhalb 60 Minuten etwa 150 - 1100 μ l Schweiß gewonnen werden. Bei zwei Probanden wurde auch bei mehrstündiger Dauer die bei der Versuchsanordnung für eine Einzelmessung nötige Menge von 200 μ l nicht erreicht. Die gewonnenen Schweißproben waren trüb, durch Hautschuppen und ähnliches verunreinigt. Nach Filtration durch ein Membranfilter war mit bloßem Auge keine Trübung mehr zu erkennen, und bei Messung der Extinktionswerte gegen H_2O betrug die Differenz in allen Fällen nicht über $7 \cdot 10^{-3}$ Extinktionseinheiten. (In den Kurven der Schweißmessungen ist dieses $\Delta-E$ gegenüber H_2O nicht berücksichtigt, so daß sich kleine Fehler in der Darstellung ergeben.)

Messungen: Handschweiß + 1,9 DMMB gegen H_2O

Abb.VIII zeigt einige der bestimmten Kurven, die Werte der Messungen sind in Tabelle V zusammengestellt.

(Abb.VIII und Tab.V)

Neben einer Senkung der α - und β -Bande zeigen alle Kurven einen Peak bei 560 nm. Die Ausprägung dieser Bande reicht von der Ausbildung einer flachen Schulter bis zur Bildung des absoluten Absorptionsmaximums. Um nähere Aufschlüsse über die Ursache dieser spektralen Veränderungen zu erhalten, wurden zwei weitere Untersuchungen durchgeführt.

1. Versuche mit einem Anionenaustauscher

(Methode siehe Seite 15)

Die spektralen Veränderungen, die durch Zugabe eines Anionenaustauschers zu dem Meßansatz von Handschweiß und 1,9 DMMB auftreten, sind in Abb.IX dargestellt.

α - und β -Bande steigen an, die α -Bande erreicht fast den Leerwert, während die β -Bande den Leerwert noch überragt. Unter Berücksichtigung der Extinktionsdifferenzen zwischen Schweiß und H_2O entspricht das spektrale Bild etwa den Veränderungen, die durch eine 0,1n NaH_2PO_4 -Lösung hervorgerufen werden. (Abb.X)

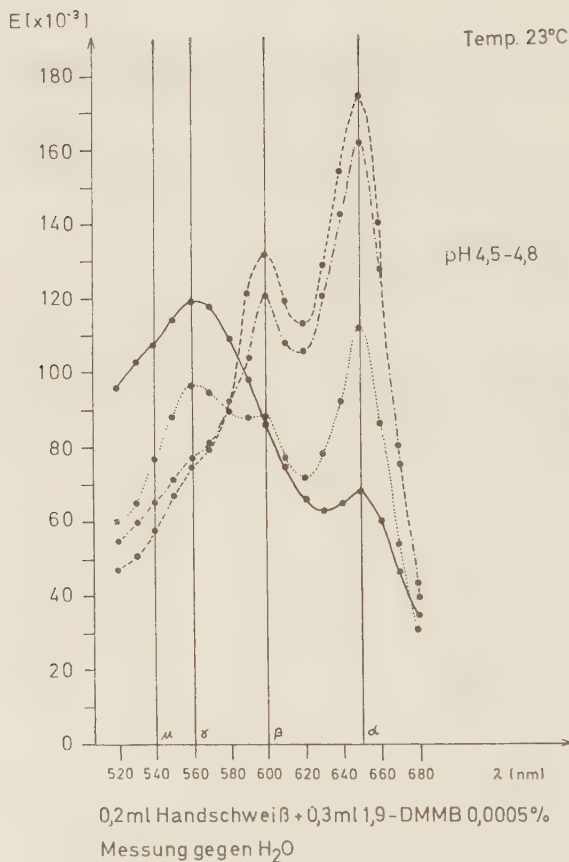


Abb. VIII

Die Abbildung VIII zeigt einige der für menschlichen Handschweiß und 1,9 DMMB ermittelten Spektralkurven. In allen Fällen findet man gegenüber dem Leerwert eine Senkung von α - und β -Bande und eine Anhebung im Kurvenverlauf bei 560 nm. Diese neue Bande bildet in einem Fall sogar das absolute Absorptionsmaximum.

Tab.V

Extinktionswerte der Schweißmessungen.

Wellenlänge (nm)			Extinktion $E \cdot 10^{-3}$						
λ			$\bar{x}$			$\bar{x}$			$\bar{x}$
520	46	49	48	71	75	73	43	45	44
530	51	54	53	78	81	80	41	45	43
540	56	61	59	84	88	86	44	50	47
550	62	68	65	91	94	93	47	54	51
560	67	74	71	97	100	99	52	59	56
570	72	78	75	95	98	97	54	59	57
580	85	90	88	84	88	86	61	66	64
590	107	111	109	75	78	77	73	77	75
600	114	118	116	63	66	65	84	85	84
610	102	104	103	51	55	53	76	77	77
620	100	101	101	43	47	45	74	75	75
630	115	117	116	41	43	42	85	88	87
640	136	140	138	43	46	45	104	108	106
650	157	160	159	49	51	50	129	130	130
660	123	125	124	41	44	43	95	97	96
670	68	72	70	28	30	29	55	56	56
680	33	36	35	16	18	17	29	30	30

 $\bar{x}$ = Mittelwert

Tab.V

Extinktionswerte der Schweißmessungen.

Wellenlänge (nm)			Extinktion $E \cdot 10^{-3}$						
λ			$\bar{x}$			$\bar{x}$			$\bar{x}$
520	46	48	47	92	100	96	56	63	60
530	49	53	51	99	106	103	62	68	65
540	55	61	58	105	111	108	74	79	77
550	63	70	67	112	116	114	85	90	88
560	71	78	75	116	121	119	94	100	97
570	77	82	80	116	120	118	92	98	95
580	91	95	93	107	110	109	87	92	90
590	119	123	121	96	100	98	86	90	88
600	131	133	132	84	88	86	85	90	88
610	119	119	119	73	76	75	75	79	77
620	113	113	113	64	67	66	70	73	72
630	127	130	129	61	64	63	76	79	78
640	152	156	154	64	66	65	91	92	92
650	174	174	174	66	67	67	111	113	112
660	139	141	140	59	60	60	84	84	86
670	79	80	80	44	47	46	52	55	54
680	42	43	43	33	36	35	29	32	31

 $\bar{x}$ = Mittelwert

Tab.V

Extinktionswerte der Schweißmessungen.

Wellenlänge (nm)			Extinktion $E \cdot 10^{-3}$							
λ			$\bar{x}$			$\bar{x}$			$\bar{x}$	
520	51	58	55	82	89	86	51	52	52	63
530	56	63	60	90	97	94	54	56	55	71
540	63	67	65	95	101	98	59	60	60	83
550	68	74	71	102	108	105	66	66	66	95
560	74	79	77	107	112	110	72	73	73	103
570	77	83	80	106	112	109	81	82	82	103
580	91	95	93	95	99	97	97	98	98	100
590	112	116	114	87	91	89	120	122	121	99
600	119	123	121	75	79	77	132	134	133	96
610	106	110	108	63	67	65	119	121	120	85
620	104	108	106	54	58	56	115	116	116	84
630	119	123	121	43	47	45	132	134	133	92
640	141	144	143	54	57	56	157	160	159	108
650	162	162	162	59	59	59	179	182	181	116
660	128	128	128	50	51	51	144	146	145	91
670	74	76	75	39	38	39	83	85	84	56
680	38	40	39	28	30	29	42	44	43	33

(E)

 $\bar{x}$ = Mittelwert

E = Einzelmessung

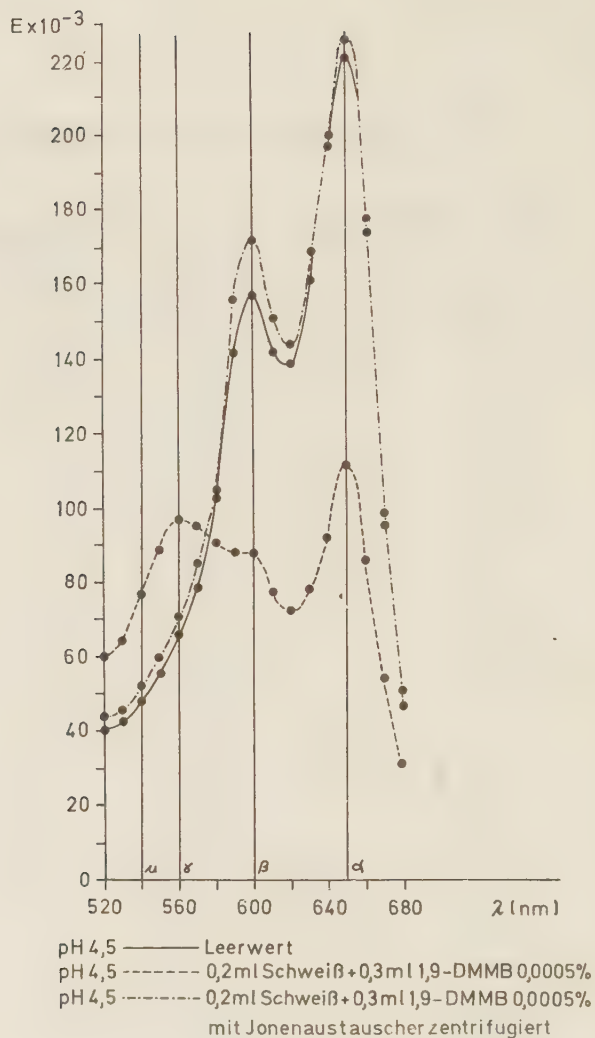


Abb. IX

Menschlicher Handschweiß führt zu einer deutlichen Senkung der α - und β -Bande. Bei 560 nm entsteht eine neue Bande, das Auftreten der μ -Bande bei 540 nm ist jedoch nicht zu beobachten. Durch einen Anionenaustauscher wird der Effekt des Handschweißes aufgehoben. Dabei ist zu beachten, daß im Schaubild die Eigenextinktion der Schweißprobe nicht berücksichtigt ist.

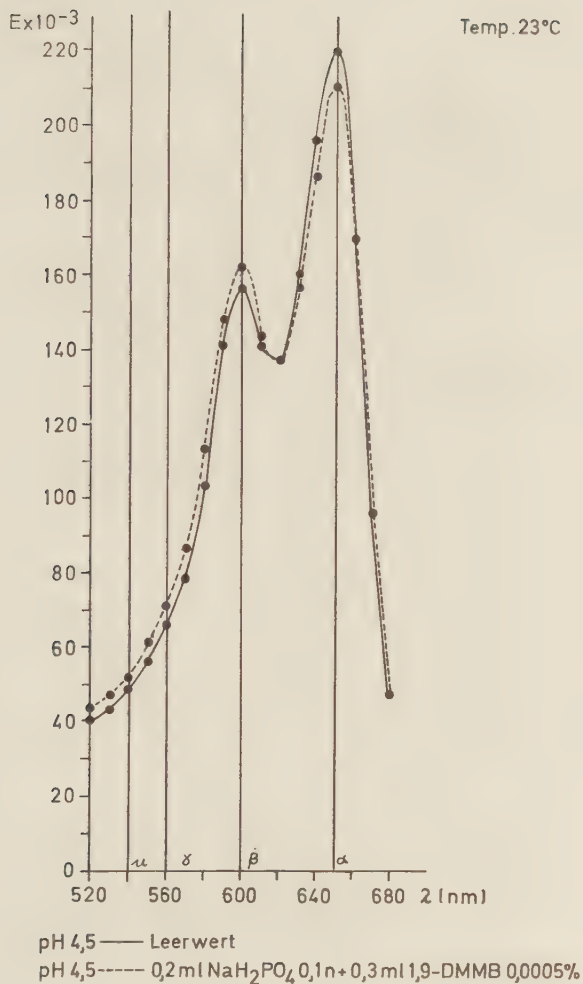


Abb. X

Die Abbildung X zeigt am Beispiel einer 0,1 n NaH_2PO_4 -Lösung die Wirkung von Elektrolyten auf das Spektrum einer 1,9 DMMB-Lösung. Die α -Bande wird gesenkt, die β -Bande wird angehoben und der gesamte Kurvenverlauf zur kurzwelligen Seite hin verschoben.

2. Wirkung auf SP 54

(Methode Seite 15)

Verglichen werden die Extinktionswerte von zwei Meßansätzen

1. Schweiß + SP 54 + 1,9 DMMB gegen H_2O
2. Schweiß + H_2O + 1,9 DMMB gegen H_2O

deren Werte in der Abb.XI dargestellt sind.

Während alle untersuchten Salze die metachromatische Reaktion von SP 54 negativ beeinflussen, zeigt sich hier der entgegengesetzte Effekt, die Metachromasie wird noch verstärkt, was im Anstieg der μ -Bande und im Absinken von α - und β -Bande zum Ausdruck kommt.

Aus beiden Versuchen ergibt sich, daß die durch menschlichen Handschweiß hervorgerufenen spektralen Veränderungen einer 1,9 DMMB-Lösung eine echte metachromatische Reaktion darstellen und nicht als Polymerisierungseffekte durch hohe Elektrolytkonzentrationen zu deuten sind. Die Bandenlage bei 560 nm (=Lage der polymeren Bande von 1,9 DMMB bei Toepfer (30)) hatte zunächst an einen solchen Polymerisierungseffekt denken lassen.

Damit ist jedoch nicht gesagt, daß der menschliche Handschweiß selbst diese Metachromasie hervorruft. Ebenso können Verunreinigungen die Ursache sein, wobei vor allem an die Wirkung von Detergentien zu denken ist, welche nach den Untersuchungen von Levine und Schubert (17) auch metachromatisch reagieren können. Aus diesem Grund wurde auch die Wirkung der zur Reinigung der Hände benutzten Seife

Abb. XI

Die Abbildung zeigt die spektralen Veränderungen gegenüber dem Leerwert (0,2 ml H₂O + 0,3 ml 1,9 DMMB), die durch menschlichen Handschweiß hervorgerufen werden. Neben der Senkung der α - und β -Bande entsteht bei 560 nm ein relativ flacher Buckel im Kurvenverlauf, der als neu aufgetretene Bande angesehen werden kann. Ein Vergleich mit dem für SP 54 ($7,5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml) und für die Kombination SP 54 + Handschweiß ermittelten Spektrum zeigt, daß sich SP 54 und menschlicher Handschweiß in ihrer Wirkung auf den Kurvenverlauf ergänzen. Die Zugabe eines Anionenaustauschers hebt die Wirkung beider Substanzen auf.

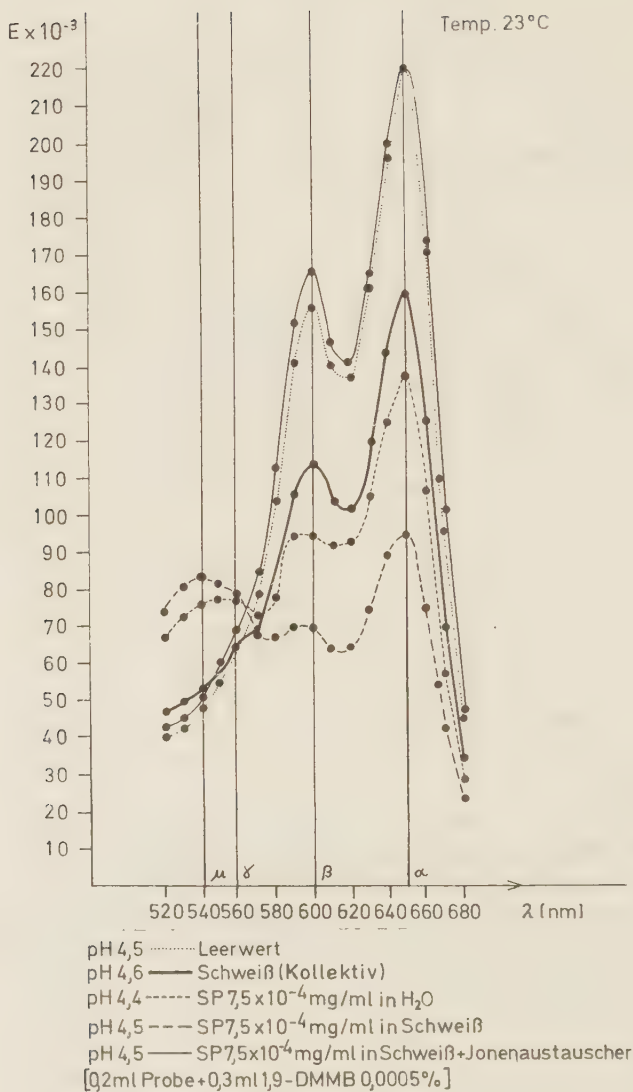


Abb. XI

untersucht, um ihren Einfluß auf die bei den Schweißproben beobachteten spektralen Veränderungen bestätigen oder ausschließen zu können.

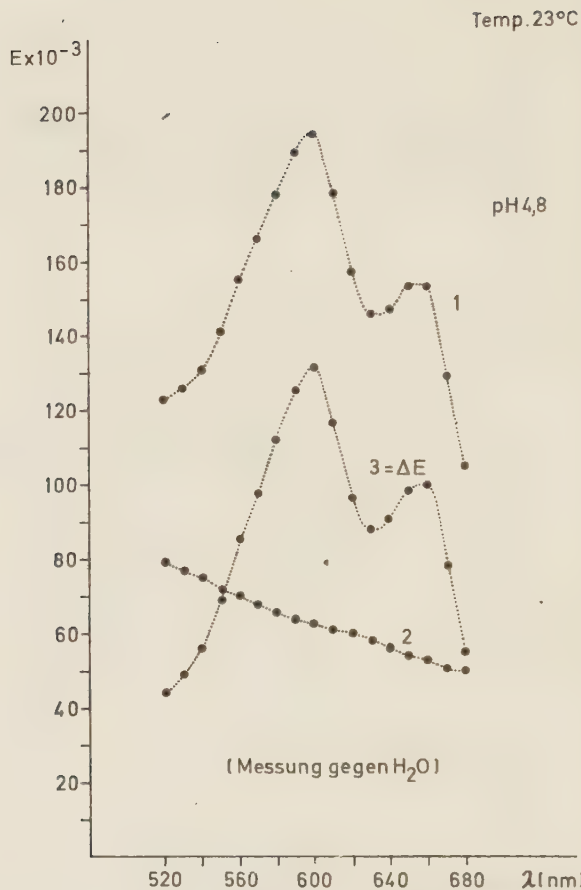
Messungen an Seifenlösungen

(Vergleiche Seite 15)

Die Verdünnungen 1:2, 1:4 und 1:10 zeigten Opaleszenz, die beiden anderen Konzentrationen waren klar. Die Abb.XIIa-d zeigen die mit diesen Seifenlösungen erhaltenen Ergebnisse.

Während die Schweißproben eine maximale Extinktion gegen H_2O von $7 \cdot 10^{-3}$ Extinktionseinheiten hatten, zeigten alle Seifenlösungen mit Ausnahme der Verdünnungen 1:50 und 1:100 eine hohe Eigenextinktion. Danach kann man annehmen, daß eine nennenswerte Verunreinigung der Schweißproben durch die Bestandteile der Seife nicht stattgefunden hat. Allerdings ist der Einfluß eventuell auf der Haut verbleibender geringer Reste von Polyphosphaten oder nicht Mizellen bildenden Detergentien, die in kleineren Mengen in der Seife enthalten sein können, nicht auszuschließen. (Eine genaue Bearbeitung dieses chemischen Problems würde aber über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.)

Man erhält jedoch bei keiner Verdünnungsstufe der untersuchten Seifenlösung ein Absorptionsspektrum, das auch nur annähernd mit dem einer Schweißprobe übereinstimmen würde. Ein Peak bei 560 nm ist in keinem Fall zu beobachten, der Quotient $E_{\lambda}:E_x$



1. 0,2ml Seifenlösung 1:2 + 0,3ml 1,9-DMMB 0,0005%
2. 0,2ml Seifenlösung 1:2 + 0,3ml H₂O
3. ΔE

Abb. XII a

Die Abbildungen XII a-d zeigen Spektren von Verdünnungen einer gesättigten Seifenlösung mit 1,9 DMMB (0,2 ml Seifenlösung + 0,3 ml 1,9 DMMB), gemessen gegen H₂O. Parallel dazu wurden die Extinktionswerte des Ansatzes: 0,2 ml Seifenlösung + 0,3 ml H₂O gegen H₂O bestimmt und die Differenz ΔE berechnet.

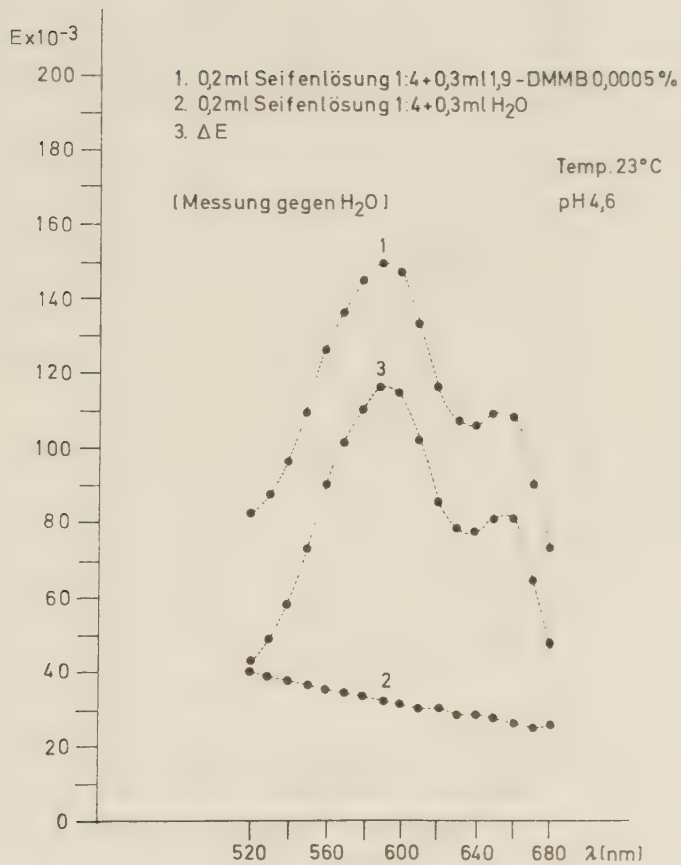
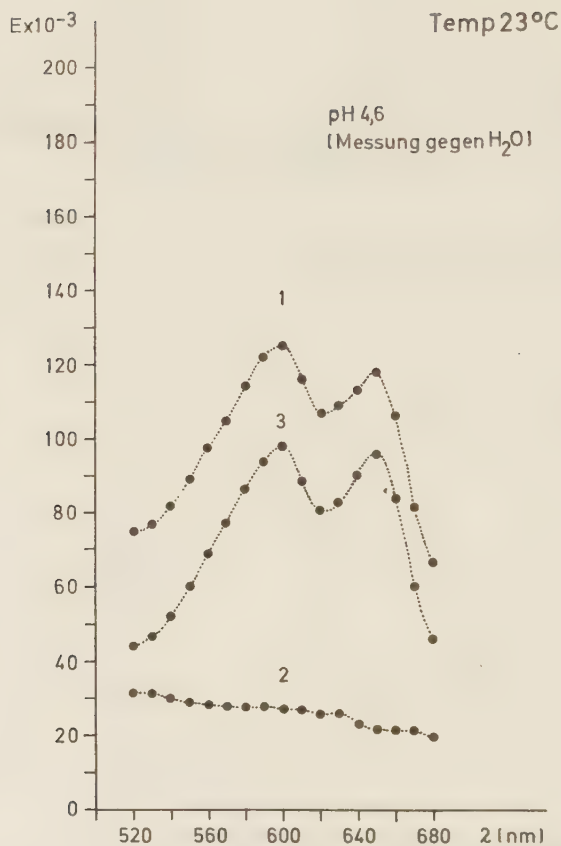


Abb. XII b



1. 0,2ml Seifenlösung 1:10 + 0,3ml 1,9-DMMB 0,0005%
2. 0,2ml Seifenlösung 1:10 + 0,3ml H₂O
3. ΔE

Abb. XII c

1. 0,2ml Seifenlösung 1:50+0,3ml 1,9-DMMB 0,0005%
2. 0,2ml Seifenlösung 1:50+0,3ml H₂O
3. ΔE

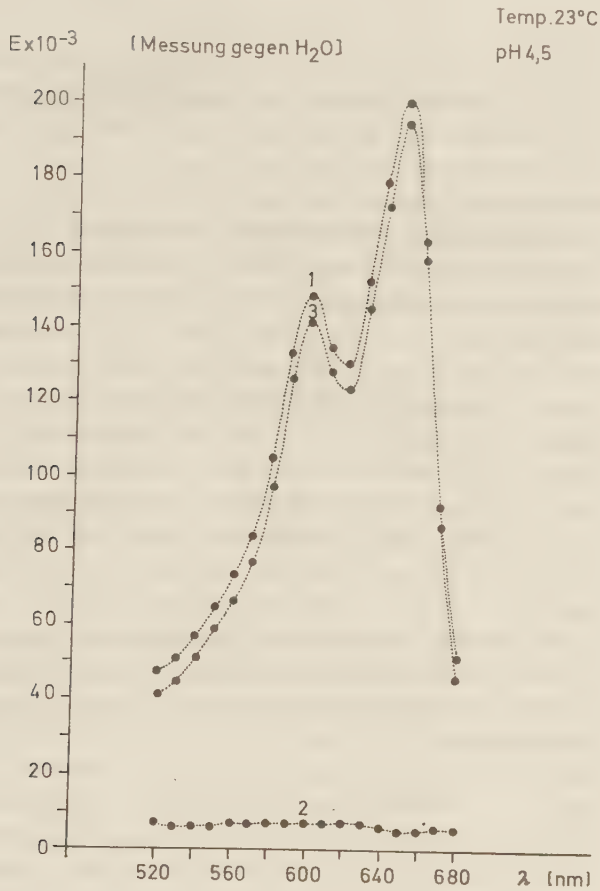


Abb. XII d

beträgt maximal 0,72, und eine neue Bande, entweder γ - oder μ -Bande, ist nicht mit Sicherheit zu erkennen. Die spektralen Veränderungen lassen sich am ehesten mit der Wirkung von Na-Myristat vergleichen, dessen Einfluß auf Methylenblau und Kristallviolett von Levine und Schubert (17) untersucht wurde. Dabei betrug die Anhebung der metachromatischen Bande maximal 10%, während die Wirkung auf α - und β -Bande wesentlich ausgeprägter war. Es ist daher wahrscheinlich, daß die im Schweiß beobachtete Metachromasie nicht von Substanzen herrührt, die als Seifenbestandteile in Spuren auf der Haut zurückbleiben können. Zwar läßt sich der Einfluß anderer exogener Faktoren nicht ausschließen, die Ähnlichkeit der Extinktionskurven bei allen Schweißmessungen und die einheitliche Bande bei 560 nm sprechen jedoch sehr dafür, daß im Schweiß eine chromotrope Substanz als physiologischer Bestandteil ausgeschieden wird, ohne daß sie dem Körper vor der Messung zugeführt wurde.

Diskussion

Bei der Bewertung der Metachromasie als Nachweisreaktion für den Pentosanpolysulfoester SP 54 müssen folgende Punkte besonders beachtet werden.

1. Die Spezifität der Reaktion.
2. Die Empfindlichkeit des Nachweises.
3. Der Einfluß von Störfaktoren.

1. Die metachromatische Reaktion ist eine Nachweisreaktion für anionische Polyelektrolyte mit hoher Ladungsdichte. Eine genauere Aussage, welcher Polyelektrolyt in einem bestimmten Fall die Metachromasie hervorruft, ist nicht zu treffen. Selbst die Differenzierung der anionischen Gruppen in Sulfat-, Phosphat- und Carboxylreste ist ohne die Anwendung von Zusatzmethoden nicht möglich. Zwar ist die Lage der μ -Bande bei verschiedenen Chromotropen unterschiedlich (Appel und Scheibe (2), Booij (6), Graumann und Arnold (12), Pal und Basu (21)), doch zeigt im vorliegenden Fall die Identität der μ -Banden von SP 54 und Heparin, daß auch die Bestimmung der Wellenlänge der metachromatischen Bande kein spezifischer Nachweis für ein bestimmtes Polyanion ist. Ebenso problematisch ist es, zu beweisen, daß die Veränderungen im Spektrum eines Farbstoffes eine

"echte" Metachromasiereaktion darstellen, wobei unter echter Metachromasie die Wechselwirkung zwischen einem Chromotrop und dem Farbstoff zu verstehen ist. Rein visuell, durch Beurteilung der Verfärbung gegenüber einer Vergleichslösung, ist eine solche Unterscheidung nicht zu treffen, durch eine Untersuchung der spektralen Veränderungen, die der Farbstoff in einer Konzentrationsreihe der Testsubstanz erfährt, ist hingegen eine Differenzierung möglich. Bei einer einmaligen Messung einer aktuellen Konzentration läßt sich diese Methode jedoch nicht anwenden. Es wurde versucht, bei den Messungen im menschlichen Handschweiß durch Einsatz eines Anionenaustauschers und durch Zugabe eines bekannten Chromotrops zwischen Elektrolyt- und Polyelektrolytwirkung zu differenzieren.

2. Die Wahl der Farbstoffkonzentration stellt ein Hauptproblem bei der Beurteilung der Metachromasie dar, es muß in jedem Fall gesichert sein, daß die Chromotropkonzentration den Äquivalenzpunkt nicht überschreitet. Dies ist jedoch nur festzustellen, wenn genügend Testsubstanz zur Verfügung steht, um eine Verdünnungsreihe ansetzen zu können.

3. Das in dieser Arbeit untersuchte Farbstoff-Chromotrop-System (1,9 DMMB und SP 54) zeigte sich empfindlich gegen den Einfluß von Elektrolyten.

Alle untersuchten Salze beeinflussten die Metachromasie negativ, während Toepfer ((30) und (31)) für 1,9 DMMB und Heparin eine nahezu vollständige Resistenz gegen Elektrolyteinflüsse festgestellt hatte. Eine Deutung für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist schwer zu geben, da die Bandenlage der Farbstoffe in beiden Fällen identisch ist, der Gebrauch verschiedener Farbstoffe also weitgehend ausscheidet. Jedoch muß immer eine Verunreinigung der Farbstoffe in Betracht gezogen werden. (Reinheitsgrad des benutzten Farbstoffes 90%, bei Toepfer 94%.)

Bei hohen Chromotropkonzentrationen konnte ein Unterschied im Verhalten von α - und μ -Bande festgestellt werden. Die μ -Bande reagierte wesentlich empfindlicher auf die Zugabe von Elektrolyten, ihre Abnahme war schon bei niedrigen Salzkonzentrationen beträchtlich. Eine Untersuchung über die Stabilität der metachromatischen Reaktion sollte daher immer das Verhalten von α - und μ -Bande erfassen, eine alleinige Bestimmung des Anstiegs der α -Bande als Maß für die Zerstörung der Metachromasie kann unter Umständen zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Andere Störfaktoren der metachromatischen Reaktion wurden auf den Seiten 9 - 11 angegeben und sollten hier nicht noch einmal genannt werden, doch allein die beschriebene Wirkung von Salzen läßt eine Anwendung des untersuchten Farbstoffes für quantitative Messungen einer möglichen Ausscheidung von SP 54 nicht zu. Erst eine chromatographische Abtrennung von SP 54 von allen anderen Begleitsubstanzen würde die metachromatische Reaktion zu einer spezifischen und quantitativen Nachweismethode machen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit der Metachromasiereaktion für den quantitativen Nachweis metachromotroper Substanzen kritisch untersucht. Dabei dienten K_2SO_4 , NaH_2PO_4 , $CaCl_2$, $NaCl$ in abgestuften Konzentrationen und menschlicher Handschweiß als Störfaktoren. Als Chromotrop wurde SP 54 (sulfatiertes Anion 1954) und als Farbstoff 1,9 Dimethylmethylenblau benutzt. Es wurde versucht, durch die Anwendung eines Anionenaustauschers und durch Zugabe eines bekannten Chromotrops zu einem vorgegebenen Meßansatz zwischen einer echten Metachromasie und der sog. Konzentrationsmetachromasie zu differenzieren, wodurch die Ausscheidung einer metachromotropen Substanz im menschlichen Handschweiß sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte. Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Metachromasiereaktion erst bei (z.B.) chromatographischer Abtrennung der chromotropen Substanz von allen Begleitstoffen zu einer quantitativen Bestimmungsmethode für Polyanionen mit hoher Ladungsdichte werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABUCHATER, S.: Toluidinblau-Metachromasie in der Tränenflüssigkeit nach Gabe von SP 54.-Med.Diss. Mainz 1971.
2. APPEL, W. u. G. SCHEIBE: Über die Bildung reversibler Polymerisate des Pseudoisocyanins durch polare, kettenförmige Hochpolymere (Heparin) I.-Z.Naturforsch. 13 b, 359 - 364 (1958).
3. ARNOLD, M.: Modellversuche zur Analyse metachromotroper Substanzen.-Histochemie 6, 1 - 7 (1966).
4. BANK, O. u. H.G.BUNGENBERG DE JONG: Untersuchungen über Metachromasie.-Protoplasma 32, 489 - 516 (1939).
5. BEYERLE, C.: Toluidinblau-Metachromasie im Speichel nach Gabe von SP 54.-Med.Diss. Mainz 1970.
6. BOOIJ, H.L.: Colloid chemical aspects of metachromasia.-Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 37 - 54 (1958).
7. DIRKS, H.: SP 54-Seine Reaktionen und Nachweismöglichkeiten in vitro und in vivo.-Med.Diss. Mainz 1970.

LITERATURVERZEICHNIS

8. DREWS, G.: Zur Anwendung der metachromatischen Färbung für die Identifizierung von Phosphorverbindungen.-Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 99 - 101 (1958).
9. EHRLICH, P.: Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten.-Arch.Anat.Physiol., Physiol. Abt. 166 - 169 (1879). (Zitiert nach SCHUBERT, M. u. D.HAMERMAN)
10. EMRICH, H.M. u. K.J.ULLRICH: Ausscheidung verschiedener Stoffe im Schweiß in Abhängigkeit von der Schweißflußrate.-Pflügers Arch.ges. Physiol. 290, 298 - 310 (1966).
11. FAUTREZ-FIRLEFYN, N.: La metachromasie in vivo au bleu de toluidine dans le spermatozoïde d'*Artemia salina* L.-Bull. Micr.appl. 4, 105 - 112 (1954).
12. GRAUMANN, W., M.ARNOLD u. U.GLEISSNER: Histologische und spektralphotometrische Untersuchungen zur Bestimmung der "Stärke der Metachromotropie".- Acta histochem. 23, 276 - 287 (1966).

LITERATURVERZEICHNIS

13. HARMS, H.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie.-Staufen, Kamp-Lintfort 1965.
14. KELLY, J.W.: The use of metachromasy in histology, cytology and histochemistry.- Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 85 - 99 (1958).
15. KIESER, E.: Pharmakokinetische Betrachtungen der Metachromasie mit dem sulfatierten Polyanion (SP 54).-Med.Diss. Mainz 1970.
16. KRAMER, H. u. G.M.WINDRUM: The metachromatic staining reaction.-J.Histochem.Cytochem. 3, 227 - 237 (1955).
17. LEVINE, A. u. M.SCHUBERT: Metachromatic effects of anionic polysaccharides and detergents.-J.Amer. Chem.Soc. 74, 5702 - 5706 (1952).
18. MISSMAHL, H.P.: Metachromasie durch gerichtete Zusammenlagerung von Farbstoffteilchen, erläutert am optischen Verhalten des Toluidinblau.-Histochemie 3, 396 - 412 (1964).
19. MÜLLER, G. u. S.WONGPHAET: Die färberischen Eigenschaften von sulfatiertem Polyanion (SP 54).- Acta histochem. 28, 190 - 192 (1967).

LITERATURVERZEICHNIS

20. MUKERJEE, P. u. A.K.GHOSH: The effect of urea on methylene blue, its self-association and interaction with polyelectrolytes in aqueous solution.-J.Phys.Chem. 67, 193 -197 (1963).
21. PAL, M.K. u. S.BASU: Polyelectrolyte chromotropes in metachromasy.-Makromol.Chem. 27, 69 - 79 (1958).
22. PAL, M.K. u. M.SCHUBERT: Measurement of stability of metachromatic compounds.-J.Amer. Chem.Soc. 84, 4384 - 4393 (1962).
23. PAL, M.K. u. M.SCHUBERT: Simple and compound metachromasia.-J.Phys.Chem. 67, 1821 - 1827 (1963).
24. RABINOWITCH, E. u. L.F.EPSTEIN: Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and methylene blue.-J.Amer.Chem.Soc. 63, 69 - 78 (1941).
25. SCHEIBE, G. u. V.ZANKER: Physikochemische Grundlagen der Metachromasie.-Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 6 - 37 (1958).

LITERATURVERZEICHNIS

26. SCHUBERT, M. u. D. HAMERMAN: Metachromasia; chemical theory and histochemical use.-J. Histochem. Cytochem. 4, 159 - 189 (1956).
27. SP 54-DOKUMENTATION, Benechemie, Chemisch-Pharmazeutische Präparate GmbH, München-Solln 1969.
28. SYLVEN, B.: On the interaction between meta-chromatic dyes and various substrates of biological interest.-Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 79 - 84 (1958).
29. SZIRMAI, A. u. E. A. BALAZS: Metachromasia and the quantitative determination of dyebinding.-Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 56 - 78 (1958).
30. TOEPFER, K.: Die Thiazinfarbstoffe.-Progr. Histochem. Cytochem. 1, 5, 1 - 78 (1970).
31. TOEPFER, K.: Spektralphotometrische und histochemische Eigenschaften von 1,9 Dimethyl-methylenblau als metachromatischem Farbstoff.-Histochemie 21, 64 - 72 (1970).

LITERATURVERZEICHNIS

32. WIAME, J.M.: The metachromatic reaction of hexametaphosphate.-J. Amer. Chem. Soc. 69, 3146 - 3147 (1947).
33. WOLFROM, M.L., R. MONTGOMERY, J.V. KARABINOS u. P. RATHGEB: The structure of heparin.-J. Amer. Chem. Soc. 72, 5796 - 5797 (1950).
34. WOOHSMANN, H.: Die metachromatische Reaktion, eine Einschlußverbindung?-Acta histochem., Jena, Suppl. 1, 124 - 126 (1958).
35. ZANKER, V.: Quantitative Absorptions- und Emissionsmessungen am Acridinorange-Kation bei Normal- und Tieftemperatur im organischen Lösungsmittel und ihr Beitrag zur Deutung des metachromatischen Fluoreszenzproblems.-Z. physikal. Chemie 200, 250 - 292 (1952).
36. ZELLMER, R.: Über Methoden der Schweißgewinnung zur Diagnostik der Mucoviscidosis.-Mschr. Kinderheilk. 111, 304 - 307 (1963).

Hiermit möchte ich Herrn Professor Dr. G. Müller für die freundliche Überlassung des Themas und die stets bereitwillige Hilfestellung bei der Fertigung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank zilt ebenso Herrn Professor Dr. J. Berger, Herrn Professor Dr. K. Beyermann und Herrn Professor Dr. D. Lommer für die mir bei der Bewältigung methodischer und statistischer Probleme gewährte Beratung und Mitarbeit.

Thomas Landgraf
6500 Mainz 42
Ahornstr. 14

L E B E N S L A U F

Am 9. April 1947 wurde ich als Sohn des damals praktischen Arztes Dr.med. Friedrich-Karl Landgraf und seiner Ehefrau Ursula, geb. Strack, in Gera / Thüringen geboren. Nach der Übersiedelung meiner Eltern in die Bundesrepublik besuchte ich von Ostern 1953 bis Oktober 1956 die Körnerschule (Volksschule) in Frankfurt / Rödelheim, von Oktober 1956 bis April 1957 die Leibnizschule in Mainz. Im April 1957 trat ich in das humanistische Rabanus-Maurus-Gymnasium ein, das ich ohne Unterbrechung durchlief. Am 10. März 1966 legte ich die Reifeprüfung ab und begann im Sommersemester 1966 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Medizin. Am 20. März 1968 bestand ich die naturwissenschaftliche-, am 30. September 1969 die ärztliche Vorprüfung. Nach dem am 8. Dezember 1972 bestandenen Staatsexamen begann ich am 2. Januar 1973 meine Tätigkeit als Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung des St.Vincenz- und Elisabeth-Hospitals in Mainz und wechselte am 1.8.73 auf die Innere Abteilung des Hauses über.

